DOI:10311931/guihaia.gxzw202301031

苦荞 TCP 转录因子全基因组鉴定及非生物胁迫分析

杨兰锋[1]，朱旭东[1]，周宾寒[1]，罗旖柔[1]，李明辉[2]，方正武[1*]

（1. 长江大学 农学院/主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心，湖北 荆州 434025；
2.长阳土家族自治县农业产业服务中心，湖北 宜昌 443500）

摘 要：TCP 是植物特有的一类转录因子，在植物生长发育过程中发挥着重要作用。该研究利用生物信息学方法对苦荞 TCP 家族进行全基因组鉴定，并通过实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）技术分析苦荞 *TCP* 基因在干旱胁迫和盐胁迫下的表达特征，为苦荞 TCP 家族的功能研究和利用奠定基础。结果表明：（1）在苦荞的基因组中鉴定出了 28 个 TCP 家族成员，不均匀地分布在苦荞的 8 条染色体上。（2）多数的苦荞 *TCP* 基因包含 1-5 个外显子。（3）系统发育分析将苦荞 TCP 家族分为了 5 个亚家族，种内 TCP 蛋白多聚集在同一分支上。（4）共线性分析表明，有 5 个苦荞 *TCP* 基因来自于全基因组复制事件。（5）顺式元件分析显示，苦荞 *TCP* 基因的启动子区域的顺式响应元件主要包含胁迫响应元件和激素响应元件两大类。（6）转录组数据分析结果显示，所有苦荞 *TCP* 基因在检测组织中均有表达（7）qPCR 结果显示，*FtTCP*3、*FtTCP*6、*FtTCP*12 和 *FtTCP*13 基因在干旱和盐胁迫下表达量发生变化，其中 *FtTCP*3 在 6 h 干旱处理和盐处理时表达量均达到峰值，说明 *FtTCP3* 基因在苦荞应对干旱胁迫和盐胁迫中起正向调控的作用。该研究为理解 TCP 基因家族的进化和功能提供了新的见解。

关键词：苦荞，TCP 转录因子，全基因组鉴定，非生物胁迫，时荧光定量 PCR

Genome-wide identification and abiotic stress response analysis of TCP transcription factor gene family in Tartary buckwheat（*Fagopyrum tataricum*）

YANG Lanfeng[1], ZHU Xudong[1], ZHOU Binhan[1], LUO Yirou[1], LI Minghui[2], FANG Zhengwu[1*]

(1. *College of Agriculture/Collaborative innovation Center for the Industrialization of Major Food Crops*, *Yangtze University,* Jingzhou, 434025, Hubei, China; 2. *Agricultural Industry Service Center for Tujia Autonomous County*, Yichang, 443500, Hubei, China)

Abstract: TCP transcription factors are a plant-specific group of transcription factors that play crucial roles in plant growth and development. In this study, bioinformatics methods were used to identified the complete genome of the Tartary buckwheat TCP gene family, and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis was conducted to investigate the expression characteristics of *TCP* genes under drought and salt stress. These finding provides a foundation for the functional exploration and utilization of the Tartary buckwheat TCP gene family. The results were as follows: (1) A total of 28 *TCP* genes were identified in the Tartary buckwheat genome, unevenly distributed across its eight chromosomes. (2) Most buckwheat *TCP* genes contained 1-5 exons. (3) Phylogenetic analysis classified the buckwheat TCP gene family into five clades, with intraspecific TCP proteins mainly clustering together. (4) Collinearity analysis indicated that, the five Tartary buckwheat *TCP* genes originated from genome-wide replication events. (5) Cis-element analysis revealed that the promoter regions of Tartary buckwheat *TCP* genes predominantly contained two types of cis-response elements: stress response elements and hormone response elements. (6) Transcriptomic data analysis demonstrated that all Tartary buckwheat *TCP* genes were expressed in the examined tissues. (7) qRT-PCR results indicated that the expression levels of *FtTCP*3, *FtTCP*6, *FtTCP*12, and *FtTCP*13 changed under drought and salt

收稿日期：2023-06-04
基金项目：国家自然科学基金项目（31671755）。
第一作者：杨兰锋（1999-），硕士研究生，研究方向为作物遗传育种，（E-mail）yanglanfeng1999@163.com。
[*]**通信作者**：方正武，博士，教授，博士生导师，主要从事作物遗传育种及品种改良研究工作，（E-mail）fangzhengwu88@163.com。

stress conditions, with *FtTCP*3 peaking at 6 hours of drought and salt treatments, suggesting that it play a positive regulatory role in Tartary buckwheat's response to drought and salt stress. This study provides new insights into the evolution and function of the TCP gene family.

Key words: Tartary buckwheat, TCP transcription factors, Genome-wide identification, Abiotic stress, real-time PCR

苦荞（*Polygonum tataricum*）为蓼科（Polygonaceae）荞麦属（*Fagopyrum*）一年生草本植物，俗称净肠草，是一种药食两用型作物（Li et al., 2019）。研究表明苦荞中蛋白质、脂肪、维生素和微量元素的含量普遍高于玉米、小麦等一般粮食作物（朱云辉等，2014)。苦荞中富含丰富的黄酮类化合物，具有抗高血压、清除自由基、抗氧化、延缓衰老及预防心脑血管疾病等功能，具有极高的营养和药用价值（王为旋等，2023)。苦荞在我国大部分地区有种植，主要分布于东北、华北、西北和西南山区，具有生育期短、抗旱耐冷凉、耐贫瘠、适应性较强等特点（杨恩泽等，2023)。有研究表明，干旱胁迫和盐胁迫对苦荞的种子萌发（李兴美等，2022）、根系形态建成（董馥慧等，2021）、地上部农艺性状（赵海霞等，2019）和抗氧化酶活性（路之娟等，2018）等均会产生影响。因此，研究苦荞的耐盐性和耐旱性，探究其抗逆机理与调控对策，对实现干旱地区农业可持续发展和保障粮食安全具有重要意义。

TCP 是植物特有的一类转录因子，以玉米中的 *TB*1 基因、金鱼草的 *CYC* 基因和水稻的 *PCF* 基因三个基因的首字母命名（Braun et al., 2012）。根据结合位点碱基序列的不同，可以将其分为两类，Ⅰ类（GGNCCCAC）主要诱导细胞分裂，Ⅱ类（GTGGNCC）抑制植物生长发育（Kosugi＆Ohashi et al., 2002）。TCP 蛋白具有两个保守结构域，bHLH（螺旋-环-螺旋）结构域和 R 结构域。bHLH 结构域由 59 个氨基酸编码，存在于所有 TCP 蛋白中，具有高度保守的特征。具有 bHLH 结构域的转录因子在植物生长代谢、信号传导及非生物胁迫中发挥重要作用（陈柳君，2022)；只有少部分 TCP 蛋白具有 R 结构域，该结构域预计呈现卷曲的形状，可能介导蛋白质相互作用和其他结构域（Chai et al., 2017）。大量研究表明 TCP 转录因子在植物响应逆境胁迫中发挥重要作用，其能通过调节细胞渗透压、改变细胞透性、减少有害物质和改变激素敏感性等方式增加植物对逆境胁迫的响应(唐羽翔等，2022)，如过表达 *PeTCP*10 能增强转基因拟南芥过氧化氢酶（CAT）活性，提高抗氧化能力，增强转基因拟南芥植株在营养生长期的耐盐性（Xu et al., 2021)；烟草（*Nicotiana tabacum*）bHLH 基因（*NtbHLH*123）过表达可以增强烟草对盐胁迫的耐受性，同时能诱导 NtRbohE 的表达和活性氧的产生，通过 NtbHLH123-NtRbohE 信号通路提高了转基因烟草耐盐性（An et al., 2019）;在拟南芥中过表达 *OsTCP*19 能减少植物失水和活性氧的产生，增加脂滴的积累，提高转基因植株幼苗和成熟植株的抗逆性（Mukhopadhyay＆Tyagi, 2015）。

目前，TCP 转录因子家族在许多植物中已经被鉴定，如在拟南芥中鉴定出 24 个 TCP 成员（Zhou et al., 2016），在李子中鉴定出 19 个 TCP 成员（Zhou et al., 2016），在葡萄中鉴定出 15 个 TCP 成员(冀志蕊等，2015)，在玉米中鉴定出 29 个 TCP 成员（Chai et al., 2017)，在茶树中鉴定出 36 个 TCP 成员（温贝贝等，2019），而在苦荞中的鉴定和表达分析还未被报道。随着基因组数据的发表，苦荞中的转录因子也被陆续报道，如 *FtMYB*12 的异源表达增强了转基因拟南芥对冷胁迫的耐受性（Zhou et al., 2015），过表达荞麦 *FtbHLH*3 基因能增强转基因拟南芥抗干旱/氧化应激的能力（Yao et al., 2017)，苦荞毛状根中过表达 *FtDREB*6 能提高植物 SOD 和 CAT 酶活性，且 MDA 含量下降，说明过表达 *FtDREB*6 能提高植物的抗旱性（赵梦雨等，2022)，但是苦荞 TCP 转录因子在非生物胁迫中的作用尚不明确。

本研究利用生物信息学方法对苦荞 TCP 转录因子进行鉴定，并结合实时荧光定量 PCR 方法对干旱处理和盐处理下苦荞 *TCP* 基因的相对表达量进行分析，以期鉴定出与苦荞非生物胁迫相关的基因。旨在探讨以下问题：（1）苦荞 TCP 转录因子家族理化性质、亲缘进化关系、结构特征和顺式作用元件分析；（2）苦荞 TCP 转录因子基因家族成员在干旱和盐胁

迫下的表达变化情况，挖掘与苦荞非生物胁迫相关的 *TCP* 基因，为深入研究苦荞 TCP 转录因子在响应非生物胁迫中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及胁迫处理

所选材料品种为苦荞品种川荞一号，种植于长江大学农学院试验基地。选取外形饱满，大小均匀的种子，用水浸泡 24 h 后剥掉外壳，25 ℃催芽，发芽后移入发芽盒中，置于 25 ℃ 16 h 光照/8 h 黑暗的人工气候培养箱中培养。将一周的幼苗用 15% PEG600 和 200 mol·L^{-1} NaCl 溶液进行胁迫处理，以清水处理为空白对照，两个处理和对照处理均在 0、3、6、9 h 时取样品全部叶片，置于 2 mL 离心管中，液氮冷冻后-80 ℃保存备用，设置 3 次生物学重复。

1.2 苦荞 *FtTCP* 基因家族成员鉴定

从苦荞基因组数据库 Pinku1（http://mbkbase.org/Pinku1/）下载苦荞的蛋白序列，从 TAIR（http://www.Arabidopsis.org/）数据库下载拟南芥蛋白序列，以拟南芥 TCP 蛋白序列为参考序列，使用 TBtools 软件的 BLAST 板块对苦荞的基因组数据进行比对和筛选，剔除重复的和无 TCP 保守结构域的序列，得到 TCP 蛋白候选序列。将所有候选蛋白提交至 NCBI CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd）和 PFAM（http://pfam.xfam.org/）数据库，具有 TCP 保守结构域的蛋白被确定为苦荞 TCP 家族成员。

1.3 苦荞 *FtTCP* 基因家族系统发育分析

从 BGDB（http://buckwheat.kazusa.or.jp/）数据库下载甜荞蛋白序列；从 Ensembl Plants（http://plants.ensembl.org/index.html）数据库下载水稻、甜菜蛋白序列。利用 TBtools 软件将苦荞 TCP 蛋白与甜菜、水稻、拟南芥和甜荞 TCP 蛋白序列进行同源比对，获取 TCP 同源蛋白。利用 Cluster-X 2.0 软件对 5 个物种的 TCP 蛋白进行多序列比对，利用 MEGA 6.0 软件采用 NJ（Neighbor-Joining）邻接法构建系统发育树，校验参数 Bootstrap 设置为 1 000，其余参数默认值。

1.4 苦荞 *FtTCP* 基因结构、理化性质和启动子序列分析

使用 MEME（https://meme-suite.org/）网站在线预测 TCP 蛋白基序；使用 NCBI CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）预测苦荞 TCP 蛋白结构域；使用 Protparam（https://web.expasy.org/protparam）在线软件，对苦荞 TCP 蛋白理化性质进行预测；利用 WOLF PSORT（https://wolfpsort.hgc.jp/）对苦荞 TCP 蛋白进行亚细胞定位预测；使用 TBtools 软件从苦荞基因组中提取 TCP 基因的启动子序列；利用 Plant CARE（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）数据库进行顺式作用元件分析。

1.5 苦荞 *FtTCP* 基因染色体定位和共线性分析

从 Pinku1 数据库下载苦荞的全基因组文件和 GFF3 注释文件，利用 TBtools 软件对苦荞 TCP 基因进行染色体定位；利用 MCScanX 软件分析苦荞和甜荞、水稻、甜菜及拟南芥 4 个物种基因序列重复事件。

1.6 转录组数据分析

从 NCBI CEO（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE126576）获得苦荞不同组织的转录组数据。提取苦荞 TCP 基因在根、茎、叶、花、花后 13 d、花后 19 d 和花后 25 d 的 RNA-seq 数据，将数据进行标准化后，利用 TBtools 软件绘制苦荞 TCP 基因的组织表达谱。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测

取 100 mg 苦荞叶片置于研钵中，加入液氮后迅速磨成粉末，使用 RNA 试剂盒提取苦荞叶片总 RNA，使用 1%琼脂糖凝胶电泳检验其质量，使用超微量核酸仪测定其浓度，使用反转录试剂盒将苦荞 RNA 反转录合成 cDNA，浓度稀释至 100 ng·μL^{-1}，-4 ℃保存备用。

使用 Primer 5.0 设计 qRT-PCR 特异性引物 （表 1），*FtH3*（HM628903）为内参基因。PCR 体系为 2× mix 10 μL、上下游引物各 0.8 μL、cDNA 1 μL、ddH$_2$O 7.4 μL。扩增程序为 95℃ 1 min；95℃ 10 s，60 ℃ 30 s，1 个循环；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，95 ℃ 30 s，40 个循环。每个样品设置 4 个生物学重复，用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算基因相对表达量。

表 1 引物序列汇总

Table1 Summary of primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence（5′-3′）	用途 Purpose
H3-QF	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG	荧光定量内参基因 Reference gene of qRT-PCR
H3-QR	CCAACAAGGTATGCCTCAGC	
FtTCP6-QF	GATAACAGGGCAAAAGCAAGGG	荧光定量 PCR Quantitative real time-PCR
FtTCP6-QR	GAACCCAGCTGGTAATCCGT	
FtTCP3-QF	CTAGGGAGCTCGGACACAAG	
FtTCP3-QR	ACCTCCGGAGAAGTCCATTT	
FtTCP12-QF	GCAATGATGAGGATGGCGAC	
FtTCP12-QR	GGGTTTGCCATTGTAGACAGTT	
FtTCP13-QF	TAACAACGGTGAGGGTCTCC	
FtTCP13-QR	CCTGATTCTCACCGGAAAAA	

2 结果与分析

2.1 苦荞 FtTCP 家族基因的鉴定与分析

基于保守结构域，从苦荞的全基因组中鉴定出了 28 个苦荞 TCP 家族成员，根据其蛋白分子量大小依次命名为 *FtTCP*1- *FtTCP*28。苦荞 TCP 家族基因理化性质差异较大，氨基酸长度在 84~475 aa 之间；分子量（MW）在 9.50-51.04 kD 之间；等电点（pI）介于 4.93~9.71 之间；酸性蛋白和碱性蛋白分布均匀；不稳定指数介于 34.88~71.12 之间；脂肪指数为 53.29~97.50；亚细胞定位预测显示，除 *FtTCP*1 和 *FtTCP*2 定位在细胞质中，其他 26 个均定位于细胞核中。

表 2 苦荞 TCP 转录因子家族

Table 2 TCP transcription factor family of Tartary buckwheat

基因名称 Genes name	基因 ID Gene ID	氨基酸长度 aa length	分子量 MW	等电点 pI	脂肪指数 Aliphatic index	亚细胞定位 Subcellular localization
*FtTCP*1	FtPinG0005197300.01.T01	84	9.50	5.12	97.50	细胞质 Cytoplasm
*FtTCP*2	FtPinG0004048100.01.T01	151	16.50	7.84	81.99	细胞质 Cytoplasm
*FtTCP*3	FtPinG0003903800.01.T01	176	19.17	5.87	73.30	细胞核 Nucleus
*FtTCP*4	FtPinG0001006600.01.T01	190	20.30	6.80	57.00	细胞核 Nucleus
*FtTCP*5	FtPinG0008237800.01.T01	187	20.87	8.56	76.79	细胞核 Nucleus
*FtTCP*6	FtPinG0001355700.01.T01	195	21.80	5.98	81.54	细胞核 Nucleus

*FtTCP*7	FtPinG0001829800.01.T01	205	23.79	9.49	73.80	细胞核 Nucleus
*FtTCP*8	FtPinG0000186600.01.T01	233	24.09	6.36	64.16	细胞核 Nucleus
*FtTCP*9	FtPinG0000362000.01.T01	208	24.20	8.92	70.82	细胞核 Nucleus
*FtTCP*10	FtPinG0001494600.01.T01	228	25.08	6.18	58.64	细胞核 Nucleus
*FtTCP*11	FtPinG0005430300.01.T01	232	25.39	8.80	73.15	细胞核 Nucleus
*FtTCP*12	FtPinG0005269500.01.T01	236	25.99	6.53	62.54	细胞核 Nucleus
*FtTCP*13	FtPinG0006627500.01.T01	252	26.96	8.84	57.38	细胞核 Nucleus
*FtTCP*14	FtPinG0006063400.01.T01	255	27.17	6.87	67.45	细胞核 Nucleus
*FtTCP*15	FtPinG0009810500.01.T01	255	27.17	6.87	67.45	细胞核 Nucleus
*FtTCP*16	FtPinG0004364900.01.T01	270	27.81	9.71	63.52	细胞核 Nucleus
*FtTCP*17	FtPinG0006862400.01.T01	263	28.23	6.29	64.68	细胞核 Nucleus
*FtTCP*18	FtPinG0003304100.01.T01	280	31.32	6.04	53.29	细胞核 Nucleus
*FtTCP*19	FtPinG0004965900.01.T01	326	34.26	6.31	69.17	细胞核 Nucleus
*FtTCP*20	FtPinG0008196900.01.T01	327	34.91	4.93	68.65	细胞核 Nucleus
*FtTCP*21	FtPinG0004598500.01.T01	302	34.98	6.91	55.23	细胞核 Nucleus
*FtTCP*22	FtPinG0002358700.01.T01	341	37.95	5.83	65.81	细胞核 Nucleus
*FtTCP*23	FtPinG0005336100.01.T01	369	39.67	6.52	55.01	细胞核 Nucleus
*FtTCP*24	FtPinG0009279400.01.T01	370	39.77	7.24	58.03	细胞核 Nucleus
*FtTCP*25	FtPinG0002336500.01.T01	422	44.89	6.98	57.25	细胞核 Nucleus
*FtTCP*26	FtPinG0006025100.01.T01	438	47.08	6.88	59.27	细胞核 Nucleus
*FtTCP*27	FtPinG0004982400.01.T01	443	47.24	6.70	57.18	细胞核 Nucleus
*FtTCP*28	FtPinG0000836000.01.T01	475	51.04	7.00	58.59	细胞核 Nucleus

2.2 苦荞 *FtTCP* 基因家族系统进化分析

为了全面分析苦荞 TCP 家族基因的功能，首先对其进化关系进行分析。选取苦荞、水稻、拟南芥、甜菜和甜荞 5 个物种共 121 条 TCP 蛋白序列构建系统发育树（图 1）。结果显示，苦荞 TCP 基因家族被划分为 5 个亚家族（A1-A5），分别含有 20、39、21、17、24 个成员。苦荞 TCP 基因在 A2 中分布最多，有 9 个成员；在 A3 亚族中分布最少，只有 2 个成员。甜荞和苦荞同属荞麦属，亲缘关系最近，在进化树末端有 20 对苦荞和甜荞 TCP 蛋白两两相聚；苦荞与水稻进化关系较远，这与单子叶和双子叶植物进化关系一致。在同一亚族内，种内的 TCP 蛋白更容易聚集在一起。

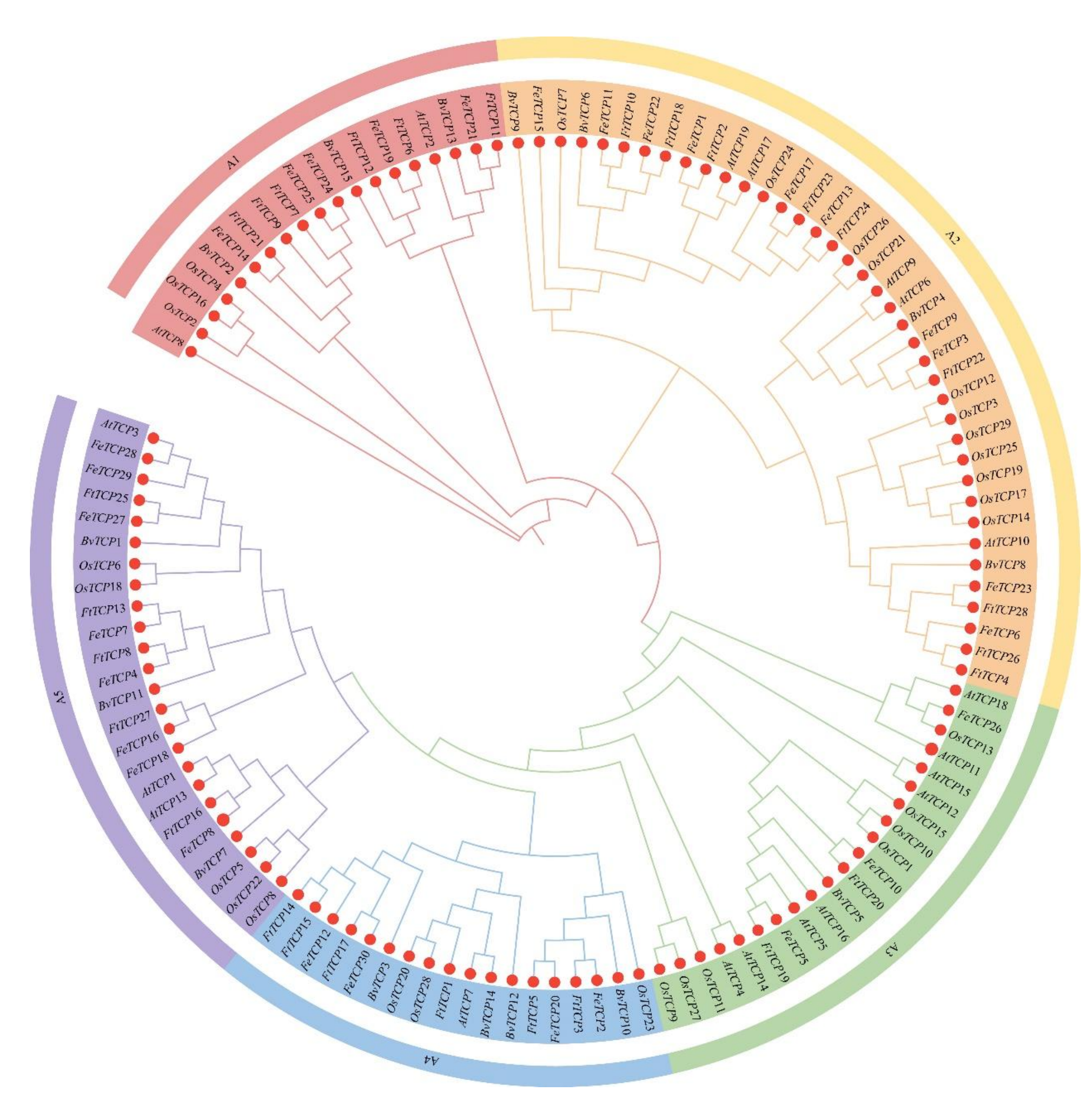
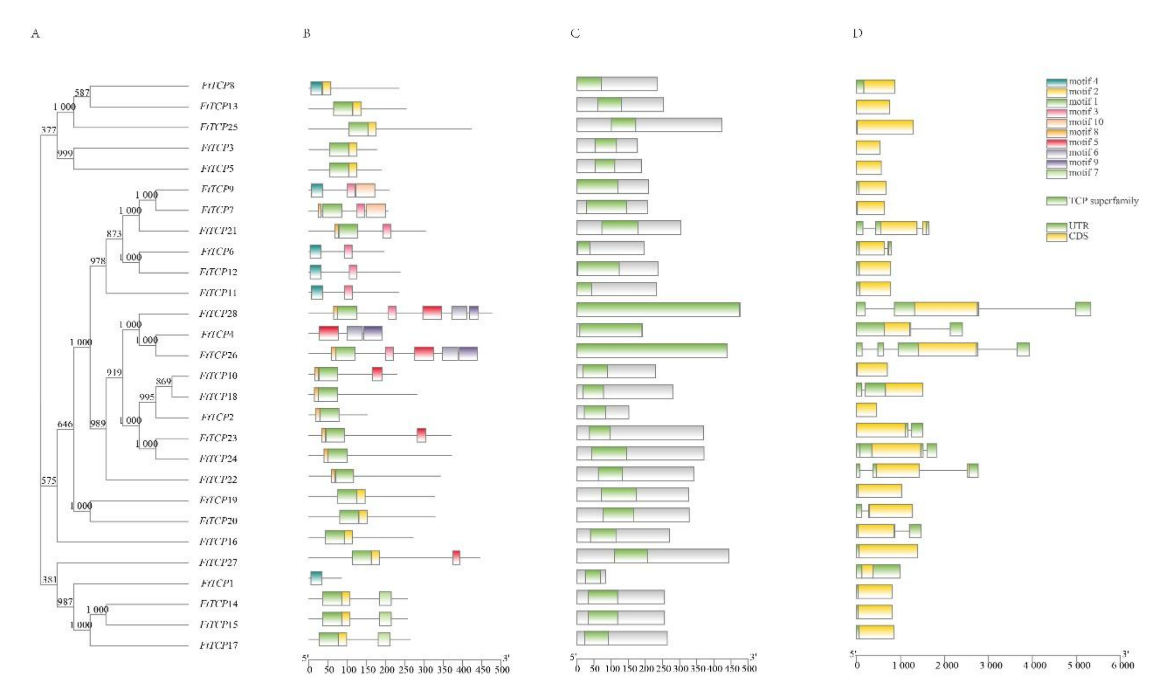


图 1 苦荞、小麦、拟南芥、甜荞、甜菜 TCP 基因家族系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of TCP gene family in Tartary buckwheat, wheat, Arabidopsis thaliana, Tartary buckwheat, and sugar beet

2.3 苦荞 *FtTCP* 基因结构和蛋白保守基序分析

利用 28 个苦荞 TCP 蛋白序列构建系统发育树（图 2：A），苦荞 TCP 蛋白被分为 4 组，其中Ⅰ组中有 5 个成员，Ⅱ组中有 6 个成员，Ⅲ组中有 12 个成员，Ⅳ中有 5 个成员。相邻分支的苦荞 *TCP* 基因具有相似的基因结构；保守结构域分析结果显示，28 个苦荞 TCP 蛋白共有 10 个 motif（图 2：B），*FtTCP*8、*FtTCP*9、*FtTCP*6、*FtTCP*12、*FtTCP*11、*FtTCP*4、*FtTCP*1 不含 motif1；motif4 位于 N 端附近。大部分苦荞 TCP 蛋白含有 2-3 个保守基序，*FtTCP*1 上只有一个保守基序，*FtTCP*7 上含有 4 个保守基序，*FtTCP*26 和 *FtTCP*28 上含有 6 个保守基序；所有苦荞 *TCP* 基因都只包含一个典型的 TCP 结构域（图 2：C）；基因结构分析显示（图 2：D），有 11 个苦荞 *TCP* 基因包含内含子，Ⅲ组中内含子数量最多，推测该亚族在进化过程中发生了内含子的插入。内含子长度也存在较大差异，导致这些基因的长度差距较大。*FtTCP*28 基因的长度最长，其内含子的长度约占基因总长度的 50%。



A. *FtTCP* 基因家族系统发育树；**B**. *FtTCP* 基因的保守基序（motif）分布，10 个 motif 用不同颜色的方框表示；**C**. *FtTCP* 基因保守结构域（domain）分布；**D**. *FtTCP* 基因内含子和外显子的分布。黄色方框表示外显子；黑色线条表示内含子绿色方框表示基因的上下游区域。

A. Phylogenetic tree of *FtTCP* genes family; **B**. Distributions of conserved motifs in *FtTCP* genes, ten putative motifs are indicated in different colored boxes; **C**. Distributions of domains in *FtTCP* genes; **D**. Exon and intron distribution of *FtTCP* genes. Yellow boxes represent exons; black lines represent introns; the upstream regions of *FtTCP* genes are indicated in green boxes.

图 2 苦荞 TCP 家族系统发育树、蛋白基序、保守结构域和基因结构

Fig.2 Phylogenetic tree, conserved domain, protein motif, and gene structure of the TCP family of Tartary buckwheat

2.4 苦荞 FtTCP 基因家族启动子顺式作用元件分析

顺式作用元件分析（图 3）显示，苦荞 *TCP* 基因启动子区主要包含胁迫响应元件和激素响应元件，其中激素响应原件种类多且分布广泛，推测苦荞 *TCP* 基因在激素调节中发挥重要作用。在 39 个响应元件中，光照响应元件有 24 个，占比约 61.53%，说明苦荞 *TCP* 基因的转录可能受光周期调控。脱落酸 ABRE 响应元件在苦荞 26 个 *FtTCP* 基因中都有分布，在 *FtTCP*12 中响应程度最高。光照响应元件 G-BOX 和 BOX4 存在于 24 个苦荞 *TCP* 基因中；厌氧响应元件 ARE 在存在与于 5 个苦荞 *TCP* 基因中；光照响应元件 Gap-box、CAG-motif 和 GTGGC-motif 分别只在 *FtTCP*19、*FtTCP*2、*FtTCP*20 中存在，生长素响应元件 TGA-box 仅在 *FtTCP*6 中分布。其中非生物胁迫响应元件如 MBS、LAR、Gc-motif、ARE 在大部分的 *TCP* 基因中都有分布，其中 ARE 只在 *FtTCP*6、*FtTCP*13 和 *FtTCP*17 基因中没有分布。故推测苦荞 TCP 基因在苦荞的光周期、激素调节和逆境胁迫中发挥重要作用。

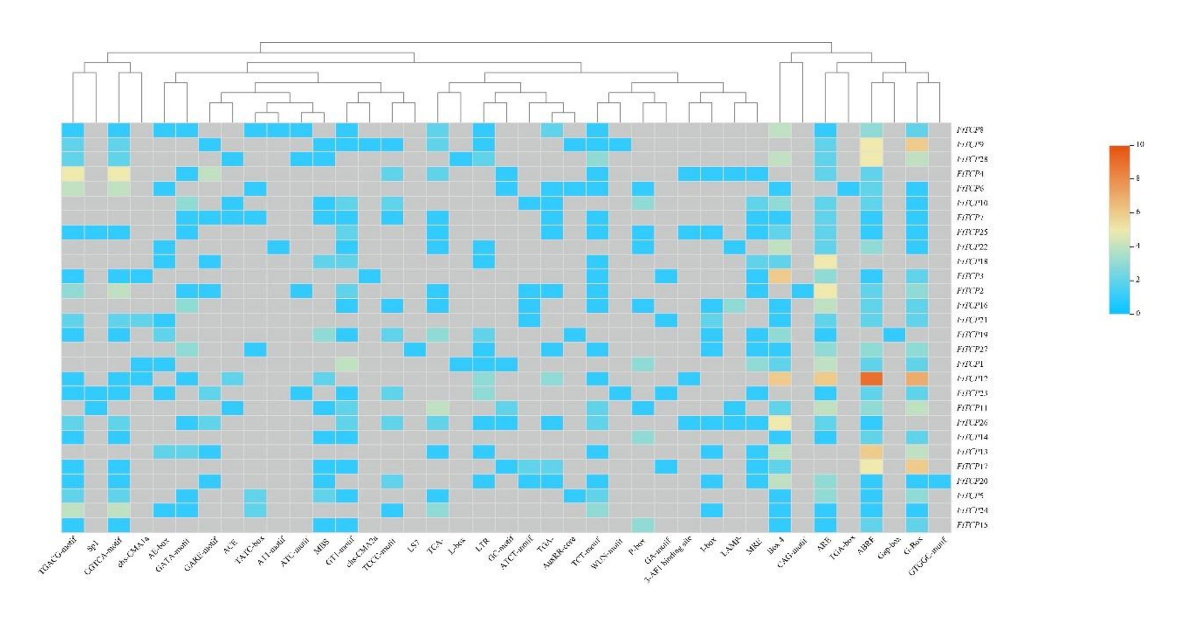


图 3 苦荞 *TCP* 基因启动子元件分析

Fig.3 Analysis of *TCP* gene promoter elements in Tartary buckwheat

2.5 染色体定位及共线性分析

28 个苦荞 TCP 基因被定位到苦荞的 8 条染色体上（图 4），结果显示，8 号染色体上分布的基因最多，有 7 个，占总基因数的 25%，说明 8 号染色体在苦荞 TCP 基因组的进化中起到了重要作用；1 号、5 号、7 号染色体上分布的基因最少，均只有两个。

为了分析 *TCP* 基因在物种内的进化关系，在苦荞全基因组内进行共线性分析（图 5），发现共有 5 个苦荞 *TCP* 基因的 4 对片段复制基因对，占基因家族成员的 19%，共线性对只分布在 Ft1、Ft3、Ft5、Ft8 染色体上，其中 Ft3 上有 2 个成员，其余的均只有一个成员。为了进一步研究苦荞 *TCP* 基因的进化过程，对苦荞、甜菜、拟南芥、水稻 4 个物种间的共线性关系进行了分析（图 6），发现苦荞和甜菜之间的共线性对有 7 对，苦荞和拟南芥之间的共线性对有 8 对，水稻和拟南芥之间的共线性对有 7 对，其中苦荞染色体 Ft2、Ft4、Ft6、Ft7 与其他物种的染色体不存在共线性。

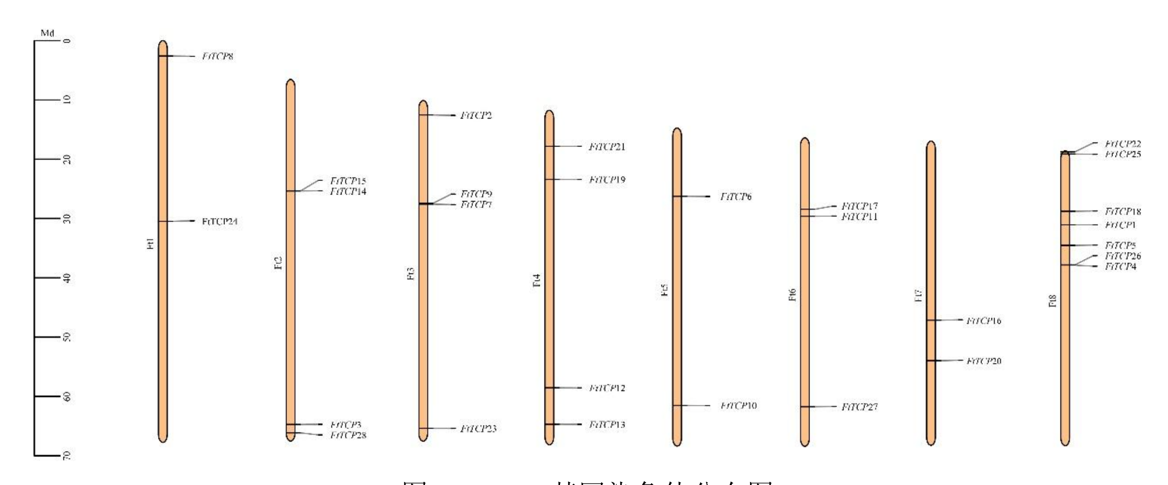


图 4 *FtTCPs* 基因染色体分布图

Fig.4 Distribution of *FtTCPs* on chromosomes

图 5　苦荞 *TCP* 基因家族共线性分析

Fig.5 Synteny analysis of Tartary buckwheat *TCP* gene family

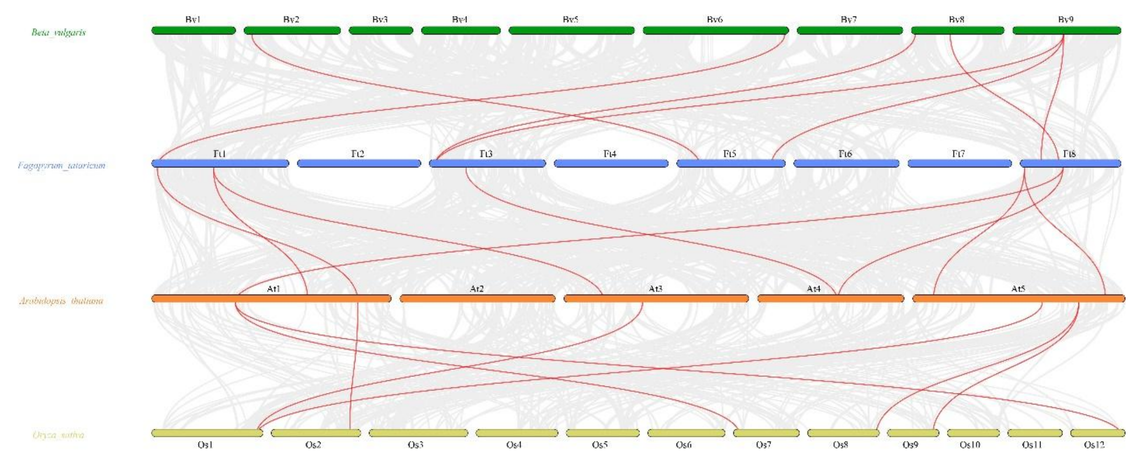


图 6 苦荞 TCP 基因家族成员与拟南芥、甜菜和水稻的基因共线性分析

Fig.6 Gene collinear analysis of Tartary buckwheat TCP gene family members and Arabidopsis, sugar beet, and rice

2.6 苦荞 FtTCP 家族基因的表达模式分析

为了探究苦荞 *TCP* 基因在不同组织下的表达模式，根据苦荞 *TCP* 基因在不同组织的转录组数据 FPKM 值绘制表达谱热图（图 7）。*FtTCP*18 在茎中表达量最高，*FtTCP*22 在根和茎中表达特异，*FtTCP*2 和 *FtTCP*4 在花中特异表达，*FtTCP*14、*FtTCP*15、*FtTCP*12、*FtTCP*9、*FtTCP*7、*FtTCP*11 在花后 13 d 表达量较高；*FtTCP*3、*FtTCP*6、*FtTCP*13 在叶中表达量最高。*FtTCP8* 在花中随着开花时间表达量越来越高，在开花后第 25 天表达最显著。*FtTCP*1 在花中表达量最高，随着开花时间表达量逐渐降低。表明苦荞 *TCP* 基因参与到苦荞根、茎、叶和花等组织的发育过程中。

根据转录组数据结果，筛选出 4 个具有组织表达特异性的苦荞 TCP 基因（*FtTCP*3、*FtTCP*6、*FtTCP*12 和 *FtTCP*13）进行干旱胁迫和盐胁迫。qRT-PCR 分析显示（图 8），在干旱胁迫下，*FtTCP*3 表达明显上调，呈现先升高后降低的趋势，在 6 h 时达到峰值；*FtTCP*6、*FtTCP*12 和 *FtTCP*13 表达量均降低，*FtTCP*6 和 *FtTCP*12 在处理 3 h 后表达量降低明显；*FtTCP*13 在处理时段均略微低于对照水平。在模拟盐胁迫处理下，*FtTCP*3 基因表达模式同干旱处理下类似；*FtTCP*13 先略微升高后降低，表达量变化不显著；*FtTCP*6 和 *FtTCP*13 表达量明显降低。

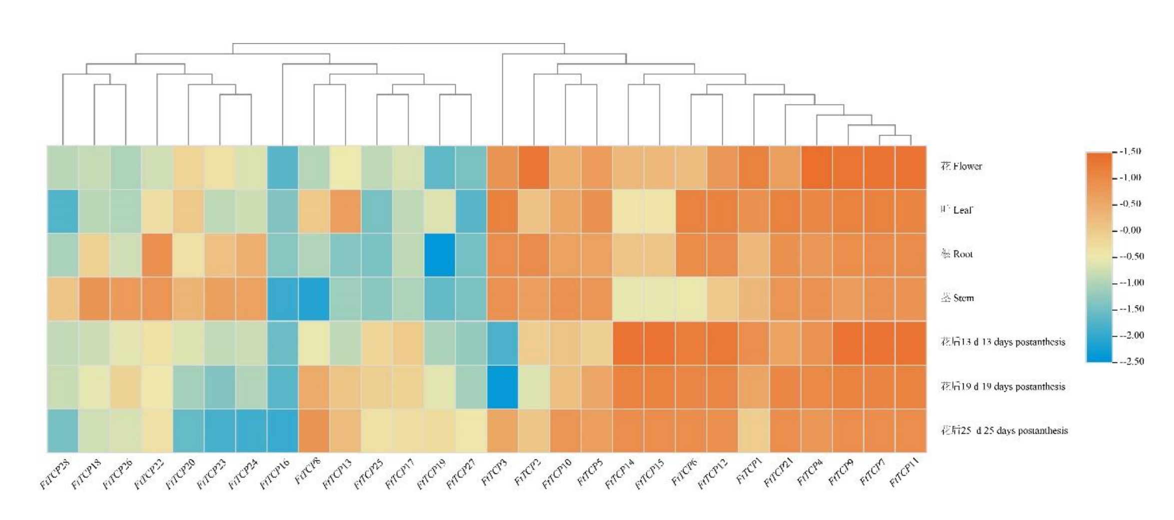
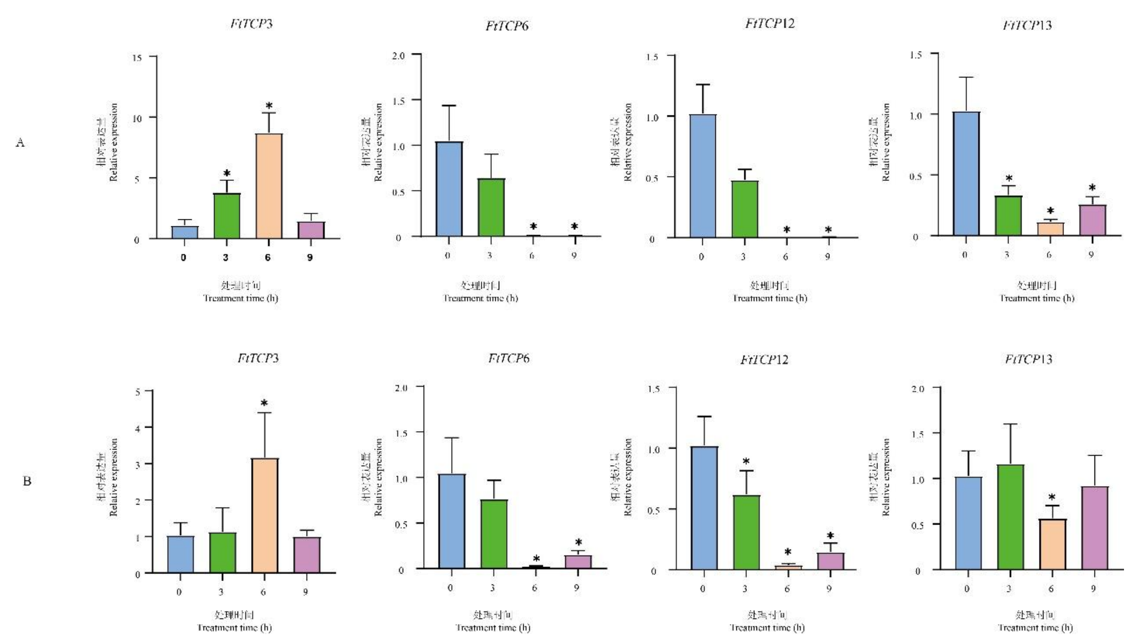


图 7 苦荞 TCP 基因家族表达分析

Fig.7 Family expression analysis of TCP gene family in Tartary buckwheat



A.干旱胁迫；**B**. 盐胁迫. *表示在 0.05 水平下有显著差异。数据表示为±SD（n=3）。

A. Drought stress; **B**. Salt stress. * indicate significantly differences at the 0.05 probability levels, respectively. The error bars indicate ± SD (n = 3).

图 8 苦荞 TCP 基因家族成员在干旱胁迫处理和盐胁迫处理下的表达模式

Fig.8 Expression patterns of Tartary buckwheat TCP gene family members under drought stress and salt stress

3 讨论

本研究共鉴定出了 28 个苦荞 TCP 家族成员，发现苦荞 TCP 家族成员的分子量和等电点存在较大差异，说明其结构复杂，暗示其功能的多样性（王玉凤等，2022）。细胞定位预测显示有 26 个苦荞 TCP 蛋白定位在细胞核中，这与 *TCP* 基因在茶树（温贝贝等，2019）中的研究结果一致。系统进化分析将苦荞、甜荞、拟南芥、水稻和甜菜的 TCP 蛋白分为 5 个亚家族（A1-A5），每个亚族中都有苦荞 TCP 蛋白分布，其中 Group A2 中包含 9 个苦荞 TCP 蛋白。*FtTCP*26、*FtTCP*4 和 *FtTCP*14、*FtTCP*15 这两组蛋白位于系统发育树的独立分支上，推测这两组基因在苦荞中单独进化而来。往往聚类关系越近，其结构和功能越相似（Ji et al., 2015）。*FtTCP*11 与 *AtTCP*2，*FtTCP*1、*FtTCP*2 与 *AtTCP*19 位于同一支分支上，推测 *FtTCP*1 、*FtTCP*2 和 *FtTCP*11 响应苦荞的非生物胁迫（Xu et al., 2017）。*FtTCP*6 和 *FtTCP*12 在种内进化树同一分支末端，具有相似的保守基序和结构，其对干旱胁迫和盐胁迫的响应程度相似（图 8），进一步说明位于同一亚族的基因往往具有相似的生物学功能。

启动子分析有助于阐明基因表达的调控和响应机制，通过对启动子区域的顺式作用元件分析，得到与植物非生物胁迫相关的重要元件，进而分析各种元件相互作用形成复杂的代谢调控网络（刘营等，2022）。苦荞 *TCP* 基因的启动子区域含有大量的光响应元件、激素响应元件以及非生物胁迫响应元件，这与在柳枝稷（Huo et al., 2019）和矮牵牛（Zhang et al., 2020）中对于 TCP 家族基因的顺式元件分析一致。其中 MYB 转录因子广泛参与植物细胞的形态建成、生长发育和逆境胁迫响应等过程（王艳朋等，2021）；bZIP 转录因子在抵御生物及非生物胁迫中发挥着非常重要的作用（马鑫磊等，2022）；ARF 是一种能够与生长素响应基因启动子区域结合的转录因子，参与植物生长发育和逆境胁迫应答过程（郝彦蓉等，2020），MYB、bZIP、ARF 在苦荞 TCP 家族启动子区域大量存在说明苦荞 TCP 转录因子在植物应对非生物胁迫方面发挥作用。此外 26 个苦荞 *TCP* 基因启动子区域均含有大量的 ABRE 响应

元件，ABRE 是一个参与脱落酸（abscisic acid ,ABA）反应的顺式作用元件，启动子区域含有多个 ABRE 响应元件说明苦荞 TCP 转录因子在 ABA 信号通路中能直接调控下游基因。有研究表明，ABRE 在 *Ntbhlh*15、*NtbHLH*135.1、*NtbHLH*40.1 中分布广泛，而这些基因均响应低温胁迫，表明 ABRE 元件在应对低温胁迫中起重要作用（Bano et al., 2021）。外源施加 ABA 可以上调 *OsTCP*19 的转录水平，从而参与调节水稻的耐旱性。（Mukhopadhyay＆Tyagi et al., 2015）。毛竹 *TCP*10 可以通过调节 ABA 信号通路对植物的耐旱性起正调控作用,通过茉莉酸甲酯（methyl jasmonate, Me-JA）介导的信号通路对侧根生长起负调控作用（张志强等, 2020）。因此推测苦荞 TCP 基因可能参与了 ABA 等激素信号转导途径，进而在非生物胁迫中发挥作用。而关于苦荞 TCP 基因在 ABA 信号途径中的调控机理，仍需进一步深入探讨。

苦荞主要种植于我国西南地区，对恶劣环境具有较强的适应性（郑逢盛等，2021）。转录组数据显示，大部分苦荞 *TCP* 基因在根、茎、叶、花中都有表达，说明苦荞 TCP 家族基因参与到苦荞根、茎、叶和花等组织的发育过程中。本试验根据苦荞不同组织转录组数据选取了 4 个具有组织特异性的苦荞 *TCP* 基因（*FtTCP*3、*FtTCP*6、*FtTCP*12 和 *FtTCP*13）进行干旱胁迫处理和盐胁迫，以干旱胁迫和盐胁迫试验的荧光定量 PCR 数据为基础，进行苦荞 *TCP* 基因的差异表达分析。发现 *FtTCP*3、*FtTCP*6、*FtTCP*12、*FtTCP*13 在干旱胁迫和盐胁迫处理后表达量均发生变化，*FtTCP*6、*FtTCP*12 和 *FtTCP*13 在干旱胁迫下表达量明显降低，在盐胁迫下 *FtTCP*6 和 *FtTCP*12 表达下降显著；*FtTCP*3 基因表达量在盐和干旱胁迫下均表现出先升高后降低的趋势，且在处理 6 h 时表达量最高。说明 *FtTCP*3、*FtTCP*6、*FtTCP*12、*FtTCP*13 均在不同程度上响应干旱胁迫和盐胁迫，推测苦荞 TCP 家族基因在响应干旱胁迫和盐胁迫下发挥作用。

4 结论

本研究从苦荞的全基因组中鉴定出 28 苦荞 TCP 基因家族成员，分属于 5 个亚家族。基因表达分析表明，苦荞 TCP 家族成员具有明显的组织特异性，qRT-PCR 检测显示，*FtTCP*3、*FtTCP*6、*FtTCP*12、*FtTCP*13 在不同程度上响应干旱和盐胁迫，推测苦荞 TCP 基因可能参与调控苦荞的干旱和盐等逆境响应过程。本研究为理解 TCP 基因家族的进化和功能提供了新的见解，对研究苦荞抗逆性和生长发育具有重要的指导作用。

参考文献

An JP, Zhang XW, Bi SQ, et al., 2019. *MdbHLH*93, an apple activator regulating leaf senescence, is regulated by ABA and MdBT2 in antagonistic ways[J]. New Phytol., 222(2): 735-751.

BANO N, PATEL P, CHAKRABARTY D, et al., 2021, Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the bHLH gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum*)[J]. Physiolo Mol Biol Plants, 27(8):1747-1764.

BRAUN N, DE SAINT GERMAIN A, PILLOT JP, et al.,2012. The Pea TCP transcription factor *PsBRC*1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching[J]. Plant Physiol (Bethesda), 158(1): 225-238.

CHAI WB, JIANG PF, HUANG GY, et al., 2017. Identification and expression profiling analysis of TCP family genes involved in growth and development in maize[J]. Physiol Molecular Biol Plants, 23(4): 779-791.

CHEN LJ, 2022. Research Progress in bHLH transcription factor of plants under low temperature stress[J]. Acta Agriculture Jiangxi, 34(1):79-87. [陈柳君, 2022. bHLH 转录因子在植物低温胁迫中的研究进展[J]. 江西农业学报，34(1): 79-87.]

DONG FH, PEI HB, ZHANG YQ, et al., 2021. Effects of drought stress on growth and physiological

characteristics of *Fagopyrum tataricum* ‘Diqing’ and *F. tataricum* ‘Heifeng 1’ at different growth stages[J]. Guihaia, 41(6) : 970－978. [董馥慧，裴红宾，张永清，等，2021，不同生育时期干旱胁迫对‘迪庆苦荞’和‘黑丰一号’ 苦荞生长及生理特性的影响[J]. 广西植物，41(6) : 970－978.]

HAO YR, DU W, HOU SW, et al., 2020. Identification of ARF gene family and expression pattern induced by auxin in *Fagopyrum tataricum*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 53(23): 4738-4749. [郝彦蓉，杜伟，侯思宇，等，2020. 苦荞ARF基因家族的鉴定及生长素诱导下的表达模式[J]. 中国农业科学，53(23): 4738-4749.]

HUO YZ, XIONG WD, SU KL, et al., 2019. Genome-wide analysis of the TCP gene family in switchgrass (*panicum virgatum L.*) [J]. Int J Genom:1-13.

JI ZR, GU YB, DONG QL, et al., 2015, Genome-wide identification and analysis of TCP gene family In grape[J]. Genom Appl Biol, 34(10):2194-2199. [冀志蕊，谷彦冰，董庆龙，等，2015. 葡萄TCP基因家族全基因组鉴定和分析[J]. 基因组学与应用生物学，34(10): 2194-2199.]

JUNG C, SEO JS, HAN SW, et al., 2008. Overexpression of *AtMYB*44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol (Bethesda), 146(2): 623-635.

KOSUGI S, OHASHI Y, 2002. DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family[J]. Plant J, 30(3): 337-348.

LI J, YANG P, YANG QH, et al., 2019. Analysis of flavonoid metabolites in buckwheat leaves using UPLC-ESI-MS/MS[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 24(7): 1310.

LI ST, 2015. The *Arabidopsis thaliana* TCP transcription factors: a broadening horizon beyond development[J]. Plant Signal Behav, 10(7): e1044192.

LI XM, HE Y, ZHOU YP, et al., 2022. Study on stress resistance to buckwheat seed germination[J]. Feed Res，11:76-79 [李兴美，何勇，周艳苹，等，2022. 荞麦种子萌发的抗逆性研究[J]. 饲料研究，2022(11) :76-79]

LIU MY, MA ZT, SUN WJ, et al., 2019. Genome-wide analysis of the NAC transcription factor family in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. BMC Genom, 20(1): 113.

LIU Y, YIN Z, JIANG YL, et al., 2022. Identification and bioinformatics analysis of *ScNRAMP* gene family in sugarcane[J]. Guihaia, 42(11):1865-1874. [刘营，尹泽，江姚兰，等，2022. 甘蔗ScNRAMP基因家族的鉴定与生物信息学分析[J]. 广西植物，42(11):1865-1874]

LU M, YING S, ZHANG DF, et al., 2012. maize stress-responsive NAC transcription factor, *ZmSNAC*1, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports, 31(9): 1701-1711.

LU ZJ, ZHANG YQ, ZHANG C, 2018. The seedling growth and root physiological traits of *fagopyrum tataricum* cultivars under drought stress[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 38(1):0112-0120. [路之娟，张永清，张楚，2018.干旱胁迫对不同苦荞品种苗期生长和根系生理特征的影响[J]. 西北植物学报，38(1):112-120.]

MA XL, XU RQ, SUO XM, et al., 2022. Genome-wide identification of the Class Ⅲ PRX gene family in foxtail millet (*Setaria italica* L.) and expression analysis under drought stress[J]. Acta Agron Sin, 48(10): 2517-2532. [马鑫磊，许瑞琪，索晓曼，等， 2022. 谷子III型PRX基因家族全基因组鉴定及干旱胁迫下表达分析[J]. 作物学报，48(10): 2517-2532.]

MUKHOPADHYAY P, TYAGI AK, 2015. *OsTCP*19 influences developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4-mediated pathways[J]. Sci Rep, 5: 9998.

TANG YX, GAO X, CUI YN, et al., 2022. Research advances in the plant TCP transcription factors [J].

Chin Sci Bull, 67:1-12. [唐羽翔，高旭，崔亚宁，等，2022. 植物TCP转录因子研究进展[J]. 科学通报，67 : 1-12.]

WANG WX, TIAN SQ, KE J, et al., 2023. Genetical variation analysis of quality and agronomic traits of 26 *Fagopyrum tatari-cymosum* lines[J/OL]. Guihaia:1-14[2023-08-15]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.q.20230320.1244.004.html. [王为旋，田爽琪，柯瑾，等，2023. 26个金苦荞品系品质性状与农艺性状的遗传变异分析[J/OL]. 广西植物:1-14. [2023-08-15]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.q.20230320.1244.004.html.]

WANG YF, MENG Y, YU HH, et al.,2022. Identification of AP2/ERF gene family in *Aquilegia vulgaris* and expression patterns analysis under salt stress[J/OL]. Guihaia:1-16[2023-08-15]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20221227.1632.007.html. [王玉凤，孟缘，于海航，等，2022. 欧耧斗菜 AP2/ERF 基因家族鉴定及盐胁迫下表达分析[J]. 广西植物:1-16. [2023-08-15]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20221227.1632.007.html.]

WANG YP, LING L, ZHANG WR, et al., 2021. Genome-wide identification and expression analysis of B-box gene family in wheat[J]. Acta Agronom Sin, 47(8): 1437-1449. [王艳朋，凌磊，张文睿，等，2021. 小麦B-box基因家族全基因组鉴定与表达分析[J]. 作物学报，47(8): 1437-1449.]

WEN BB, LUO Y, LIU DM, et al. Identification and expression profiling analysis of TCP family genes involved in growth and development in *Camellia sinensis*[J]. Acta Hortic Sin, 46(12): 2369-2382. [温贝贝，罗勇，刘冬敏，等，2019. 茶树TCP转录因子的鉴定与表达分析[J]. 园艺学报，46(12): 2369-2382.]

XU RR, GAO HY, ZHANG SZ, et al., 2017. Genome-wide identification and phylogenetic, comparative genomic, alternative splicing, and expression analyses of TCP genes in plants[J]. Plant Gene, 12: 23-32.

XU YZ, LIU HL, GAO YM, et al., 2021. The TCP transcription factor *PeTCP*10 modulates salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Celll Rep, 40(10): 1971-1987.

YANG EZ, XIE R, HAN PA, et al., 2023. Genetic diversity and comprehensive evaluation of phenotypic traits of 162 buckwheat resources in Inner Mongolia[J]. Crops, 13: 1-9.[杨恩泽，谢锐，韩平安，等，2023. 内蒙古162份苦荞资源表型性状的遗传多样性及综合评价[J]. 作物杂志，13:1-9.]

YAO PF, LI CL, ZHAO XR, et al., 2017. Overexpression of a Tartary buckwheat gene, *FtbHLH*3, enhances drought/oxidative stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Front Plant Sci, 8:625.

ZHANG ST, ZHOU Q, CHEN F, et al., 2020. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of TCP transcription factors in *Petunia*[J]. Int J Mol Sci, 21(18):6594.

ZHANG ZQ, LU SX, MA ZH, et al., 2020. Bioinformatics identification and expression analysis of TCP transcription factor family in strawberry[J]. Acta Bot Boreal, 40(12): 2031-2043. [张志强，卢世雄，马宗桓， 等，2020. 草莓TCP转录因子家族生物信息学鉴定及基因表达分析[J]. 西北植物学报，40(12): 2031-2043.]

ZHAO HX, PEI HB, ZHANG YQ et al., 2019. Effect of phosphorus on growth and phosphorus absorption and distribution in *Fagopyrum tataricum* under drought stress[J]. J Arid Land Resourc Environ, 33(3):177-183. [赵海霞，裴红宾，张永清等，2019. 施磷对干旱胁迫下苦荞生长及磷素吸收分配的影响[J]. 干旱区资源与环境，33(3):177-183]

ZHAO MY, YANG D, HAO YR et al., 2022. Cloning of a transcription factor gene *FtDREB*6 in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) and identification of its function in drought

resistance[J]. J Plant Genet Resourc, 23(4)：1132-1142. [赵梦雨，杨迪，郝彦蓉，等，2022. 苦荞转录因子 *FtDREB6* 基因克隆及其抗旱功能鉴定[J]. 植物遗传资源学报，23(4)：1132-1142.]

ZHENG FS, WANG HH, WU QD, et al., 2021. Genome-wide identification of VQ gene family in *Fagopyrum tataricum* and its expression profiles in response to leaf spot pathogens[J]. Sci Agricult Sin, 54(19): 4048-4060. [郑逢盛，王海华，邬清韬，等，2021. 苦荞VQ基因家族的全基因组鉴定及其在叶斑病原与激素处理下的表达谱分析[J]. 中国农业科学，54(19): 4048-4060.]

ZHOU ML, WANG CL, QI LP, et al., 2015. Ectopic expression of *Fagopyrum tataricum FtMYB*12 improves cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Growth Regul, 34, 362–371.

ZHOU YZ, XU ZD, ZHAO K, et al., 2016. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the TCP gene family in *Prunus mume*[J]. Front Plant Sci, 7: 1301.

ZHU YH, GUO YX. 2014. Research progress in development and utilization of Tartary buckwheat resource in China[J]. Sci Technol Food Ind, 35(24): 360-365. [朱云辉，郭元新，2014. 我国苦荞资源的开发利用研究进展)[J]. 食品工业科技，35(24): 360-365.]